

⑪ 公開特許公報(A) 平1-124382

⑫ Int.Cl.⁴C 12 N 5/00
A 61 K 9/10
35/12

識別記号

序内整理番号

E-8515-4B
L-7417-4C
8213-4C※

⑬ 公開 平成1年(1989)5月17日

審査請求 未請求 請求項の数 36 (全21頁)

⑭ 発明の名称 導入抗原タンパク質を有する動物由来細胞

⑮ 特願 昭63-164103

⑯ 出願 昭63(1988)6月30日

優先権主張 ⑰ 1987年6月30日⑯米国(US)⑯068288

⑰ 1988年5月27日⑯米国(US)⑯197445

⑱ 発明者 イヴ セニコロ アメリカ合衆国 テキサス州 77840 カレツジ ステーション フオツクスファイア フアーレイ 2100

⑲ 発明者 ガレット エム イー アメリカ合衆国 テキサス州 77840 カレツジ ステーション ラングフォード ストリート 1115

⑳ 出願人 ハップグード セーヴ オランダ領アンチル キュラソー デリュイター カーデ 62 キュラソー インターナショナル トラスト コムバニー ナームローゼ フエンノートチャップ内

㉑ 代理人 弁理士 中村 稔 外8名
最終頁に続く

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称 導入抗原タンパク質を有する
動物由来細胞

2. 特許請求の範囲

(1) 細胞の他の細胞に対する結合およびそれとの
融合を誘導する抗原タンパク質を膜中へ導入さ
れた動物由来細胞。(2) 動物細胞が血液由来細胞である、請求項(1)記
載の動物由来細胞。(3) 細胞が赤血球である、請求項(1)記載の動物由
来細胞。(4) 細胞と、挿入させるタンパク質を二重層内に
含むリボソームとの組合せにより抗原タン
パク質が細胞内に挿入された、請求項(1)記載の
動物由来細胞。(5) 動物由来細胞と、挿入させる抗原タンパク質
を二重層内に含むリボソームとのフソーゲン誘
発結合により抗原タンパク質が動物由来細胞内
に挿入された、請求項(1)記載の動物由来細胞。

(6) フソーゲンがタンパク質またはペプチドであ

る、請求項(5)記載の動物由来細胞。

(7) フソーゲンがポリエチレングリコールである、
請求項(5)記載の動物由来細胞。(8) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上
の細胞障害物質を含む、請求項(1)記載の動物由
来細胞。(9) 細胞障害物質がタンパク質である、請求項(8)
記載の動物由来細胞。(10) 細胞障害物質がリシン、アブリン、ゲロニン、
およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒生物学
的活性フラグメントからなる群から選ばれる、
請求項(5)記載の動物由来細胞。(11) 細胞障害物質がゲロニンまたはその毒生物学
的活性フラグメントである、請求項(9)記載の動物
由来細胞。(12) 抗原タンパク質がヒトCD4抗原である、請
求項(1)記載の動物由来細胞。(13) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上
の細胞障害物質を含む、請求項(1)記載の動物由
来細胞。

- 00 細胞障害物質がリシン、グロニン、アブリン、およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒物学的活性フラグメントからなる群から選ばれる、請求項記載の動物由来細胞。
- 09 さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の治療薬を含む、請求項記載の動物由来細胞。
- 09 治療薬が抗ウイルス薬である、請求項記載の動物由来物質。
- 09 治療薬がA Z T、アジドー3' -デオキシチミジン(A Z T)三リン酸、ジデオキシンチジン三リン酸およびリバビリンからなる群から選ばれる、請求項記載の動物由来物質。
- 09 二重層内にヒトCD4抗原を取込んだリボソーム。
- 09 さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の細胞障害物質を含む、請求項記載のリボソーム。
- 09 細胞障害物質がリシン、グロニン、アブリン、およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒物学的活性フラグメントからなる群から選ばれる、

請求項記載のリボソーム。

- (21) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の治療薬を含む、請求項記載のリボソーム。
- (22) 治療薬がA Z T、アジドー3' -デオキシチミジン(A Z T)三リン酸、ジデオキシンチジン三リン酸、およびリバビリンからなる群から選ばれる、請求項(21)記載のリボソーム。
- (23) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項(10)記載の細胞の治療有効量を含む組成物。
- (24) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項記載の細胞の治療有効量を含む組成物。
- (25) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項記載のリボソームの治療有効量を含む組成物。
- (26) 請求項記載の細胞の治療有効量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (27) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁され

た請求項記載のリボソームの治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。

- (28) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項記載の細胞と請求項記載のリボソームとの混合物の治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (29) 疾患が後天性免疫不全症候群である、請求項(26)記載の方法。
- (30) 疾患が後天性免疫不全症候群である、請求項(27)記載の方法。
- (31) 疾患がエイズ関連コンプレックスである、請求項(28)記載の方法。
- (32) 痢理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項記載の細胞の治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (33) 血液細胞中のウイルス粒子の存在を測定する定量的検定法であって、
(a) 請求項記載のリボソームの試料(試験リボソームと称す)を調製する、

- (b) ウィルス疾患をもつ疑いのある患者から血液の試料をとり、それから白血球(試験血液細胞と称す)を捕集する、
(c) 健康なヒトから血液の試料をとり、それから白血球(対照血液細胞と称す)を捕集する、
(d) 試験血液細胞および対照血液細胞を放射性同位体の元素で標識する、
(e) 等数の放射性標識試験血液細胞を培養皿の3ウエルのそれぞれ中へ、および等数の対照血液細胞を前記培養皿の他の3ウエル中へ、6ウエルがそれぞれ同数の細胞を含むように塗布する、
(f) 3対照細胞含有ウエルの1つおよび3試験細胞含有ウエルの1つに試験リボソームの分割量を加えて少くとも1~10リボソーム毎細胞の最終濃度比で、しかしまかく対照および試験細胞試料のそれぞれに対して等しいリボソーム/細胞比を生成させる、
(g) 6ウエルのそれぞれの中の細胞を約3.7セ

の最適温度で細胞-リボソーム融合を起させ
る十分な時間（最適には約10～24時間）
インキュベートする。

(h) 4つの非リボソーム含有ウエルの、1つの
ウエルが試験細胞を含み他のウエルが対照細
胞を含む2つのウエルに、1%トライトンX
-100または他の適当な洗浄剤0.1μlを加
えることにより2ウエル中の細胞を溶解する。

(i) 培養のそれぞれの上澄み液を少くとも100
μlの分割量とり、それらの中の放射能を液
体シンチレーションまたは等価の操作により
測定する。

(j) 試験血液細胞および対照血液細胞の両試料
に対する比濃度(S P R E L)の値を式、

$$S P R E L = \frac{E R - S R}{M R - S R}$$

（式中、S P R E L、E R、M Rおよび
S Rは本明細書の実施例5においてそれらに
帰着させた意味を有する）

を用いて計算する。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

本発明は、細胞の他の細胞に対する結合および
それとの融合を誘発する抗原タンパク質を膜中に
導入された動物由来細胞に関する。より詳しくは
本発明は、外膜がその中に、修飾された細胞または
リボソームを種々の標的細胞、特にウイルス例
えばヒト免疫不全ウイルス（以下HIVとして示す）
に感染した細胞に生体内および試験管内で選
択性に結合させる特異性タンパク質物質を取込ん
だ修飾された細胞およびリボソームに関する。

背景の情報

後天性免疫不全症候群（エイズ）は明示された
年代学的配列の症状および高い死亡率を特徴とする
ビルレント疾患である〔カラム（Curran, J.W.）
ほか、「エイズの疫学」、サイエンス（Science）,
229, 1352～1357（1985）〕。エイズは1981年に初めて記載され、そのときから米国のみで約400,000例を有する流行割合およ
び90%以上の3年死亡率に達した。今日米国中

ことを含む方法。

(34) 試験血液細胞および対照血液細胞がリンバ
球である、請求項（33）記載の検定法。

(35) 放射性元素がクロム-51である、請求項
（33）記載の検定法。

(36) 存在を測定されるウイルス粒子がエイズウ
ィルス粒子である、請求項（33）記載の検定
法。

に約100万のヒトがヒト免疫不全ウイルス
(HIV)に感染されたと推定される。HIVは
コアタンパク質、ゲノムRNAおよび酵素逆転写
酵素を含むレトロウイルスとして分類されている。
HIVの若干の抗原に対する抗体が感染したヒト
の血清中に存在する。

エイズにおける免疫不全の特徴はT4ヘルパー
/インデューサーリンパ球の消耗である

〔ゴットリープ（Gottlieb）ほか、ニュー・イング
ランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N. Eng
J. Med.），305, 1425～1431（1981）〕。
この欠損は主にリンパ球のこの集団のHIVによ
る選択性感染の結果である。ヘルパーリンパ球
の表面上に存在するT4分子（CD4抗原を示す）
はT4リンパ球の表面に対する特異的結合後に細
胞に入るHIVウイルスに対する受容体として
関連づけられた〔ダルグレイシ（Dalglish）は
か、ネーチャー（Nature），312, 763～767
（1984）〕。ウイルスが入る機構は完全には
示されなかったが、しかし受容体仲介エンドサイ

トーシスまたはHIVエンベロープと細胞膜との直接融合に類似するであろう〔ステイン(Stein)ほか、セル(Cell), 49, 659~668 (1987)〕。

フーザーゲン(fusogen)タンパク質、gp120 (分子量120,000 ドルトンの糖タンパク質)と称される〔マクドゥガル(Mc Dougall)ほか、サイエンス(Science), 231, 382~385 (1986)〕、がHIV表面上に確認され、このタンパク質がウイルスとリンパ球との間の融合を仲介する作用をすることができる。細胞の内部に入るとウイルスRNAが逆転写酵素によりDNA中に転写される。その後DNAが宿主ゲノム中へ組込まれる。しかし、HIV-DNAの大半は組込まれないで細胞質中に保たれる。現在、感染細胞が「活性化されるまでHIV複製がこの段階で制限されることが知られている〔マクドゥガル(Mc Dougall)ほか、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunology), 135, 3151~3162 (1985)〕。HIV感染後の複製の潜在的活

性化因子にはウイルス例えは巨大型肝炎、ヒトサイトメガロウイルスおよび单纯ヘルペスウイルスが含まれると思われている。活性化後、HIVが複製され、次いで細胞表面上に立てられる。次いで成熟ビリオンがT4リンパ球の表面膜からの出芽により形成される。HIV複製の開始後T4リンパ球が殺されるであろう。

T4リンパ球に対するHIVウイルスの細胞変性効果は現在知られていないけれども、HIV感染が起ると、ウイルスのgp120抗原が感染T4リンパ球の表面上に発現されることが観察された。このタンパク質の通常存在するCD4抗原に対する親和性のために他のT4リンパ球(末感染でCD4抗原を有する)が感染リンパ球と融合することができる。生じた細胞の結合および融合が、融合に含まれた両方またはすべての細胞を殺すと思われる(ザグリ(Zagury)ほか、サイエンス(Science), 231, 850~853 (1986))。例えば、表面上にCD4抗原のない細胞系のT4リンパ球並びに細胞と抗CD4抗体との反応によ

り抗原がマスクされたT4細胞は通常状態下でHIV感染T4細胞との融合を示さない〔マクドゥガル(Mc Dougall), 前掲〕。

この融合過程は若干のHIV感染および多数の非感染T4細胞を包含することができ、大シシチウムの形成を生ずることができ、それが次いで細胞内皮系の細胞により剥離から除去されるか、さもなければ溶解することができる(例えば脳のような器管中)〔ショウ(Shaw)ほか、サイエンス(Science), 227, 177~181 (1985); ガートナー(Gartner)ほか、サイエンス(Science), 233, 215~219 (1986)〕。

T4リンパ球は免疫応答において中心的役割を演ずる。それはマクロファージ、細胞障害性T細胞、NK(ナチュラルキラー)細胞およびBリンパ球とともに均一に含まれる。従って、T4リンパ球集団の選択的消耗でも多くの免疫欠損を生じ、エイズに特有の生命を奪かず日と見感染を生ずる〔ボウエン(Bowen)ほか、アナルス・オブ・インターナル・メディシン(Ann. Intern. Med.), 103,

704~709 (1985)〕。さらに単球およびマクロファージの一一定集団もまたCD4抗原を発現し、研究によりこれらの細胞もまたHIV感染されることができることが示された〔ホー(Ho)ほか、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベティゲーション(J. Clin. Invest.), 77, 1712~1715 (1986)〕。单球のHIV感染は走化性における欠損を生ずることができ、それはエイズで報告された。感染マクロファージはHIVウイルスを中枢神経系へ運ぶことができ、この疾患に生ずる亜急性脳炎の発現を可能にする(ガブズダ(Gabuzda)ほか、アナルス・オブ・ノイロロジー(Ann. Neurology), 20, 289~295 (1986))。HIV感染単球は腫瘍壊死因子を含む種々の因子を生ずることができ、それがエイズの慢性熱およびまた悪液質の関連状態(一般栄養不良)を説明できた。

さらに、新抗原に対する低い抗体応答と結合した高濃度の免疫グロブリンによる多クローン性活性化からなるBリンパ球異常がエイズで普通であ

り、HIV感染の直接的結果であることができる。エイズの一層進行した段階における患者は通常無力性である（すなわち、普通の抗原に対する減退した免疫応答を示す）。

エイズは治療が非常に困難なことが証明され、治癒するに任される。これまでに若干の異なる方法が試みられた。現在研究されている可能性のある処置は次のものである：

(a) 逆転写酵素の阻止因子

この型の治療は、標的酵素がヒト細胞中に見出されないので非常に選択的であることができる。この種の始原型薬物はアジド-3'-デオキシチミジン（AZT）である。この薬物はI、IIおよびIII期の研究に合格し、現在エイズをもつ患者および以前にニューモシスティス（*Pneumocystis*）感染を有した患者の治療に承認されている。研究はこの薬物で処置した患者がヘルパーTリンパ球の高濃度を示しました約1/3が陽性皮膚試験を示すことを示した（後者は以前に無力性であった）。さらに、その疾患に特有の

許容できない毒性水準を示した〔ゲルマン（Gelmann）ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・メディシン（Am. J. Med.），78，737～741（1985）〕。エイズ患者に試験された類似物質はインターロイキン-2である。後者はTリンパ球の全数を高め、リンパ球からのHIVの分泌を低下するが、しかし排除しないことが示された。それはまたカボジ肉腫、後者はエイズの一層進行した期に関連する悪性腫瘍、の最少程度の退行に間接づけられた〔ブロダー（Broder）ほか、ランセット（Lancet），627～630頁（1985）〕。

(d) 移植

骨髄移植が若干のエイズ患者に試みられ、その目的は患者の免疫反応性の再構成であった。そのような療法は長期経続よりはむしろ一過性の状態の改善を生じたにすぎなかった。

リポソームと細胞または核エンベロープとを有効に溶融させる方法が記載された

（アービンテ（Arvinte）ほか、バイオケミスト

神経系欠損に対する改善がある〔ヤーチェン（Yarchoan）ほか、ランセット（Lancet），575～580頁（1986）参照〕。しかし、臨床および免疫パラメーターにおける前記改善にもかかわらず、ウイルスがリンパ球中に生き残ることが認められる。

(e) 一般抗ウイルス剤

現在リバビリン（ribavirin）、ホスカーネット（Foscarnet）（HPA-23）およびスラミン（Suramin）のような化合物が研究中である。現在これらの物質の有効性について利用できるデータがない。

(f) 免疫修飾物質

この型の処置にはエイズをもつ患者中の欠損免疫系を高めまたは再構成する試みが包含される。そのような試みは数年間行なわれた。試験された免疫修飾物質の1つはα-インターフェロン、抗ウイルス免疫修飾および抗増殖効果を有する白血球由来糖タンパク質である。この物質はヒト患者に単に最少の有効性を示したが、

リ-（Biochemistry）、25，765～772（1986）参照〕。多くの場合に、そのような融合は、タンパク質、ペプチド、ポリエチレングリコール、ウイルスエンベロートンタンパク質などであることができるソーゲンといわれる誘導性物質を用いて行なわれた。若干の場合に融合誘導性物質には媒質の改変状態が含まれる。従って、低pHがリポソームと核エンベロープとの融合の誘導に有利に使用された〔アービンテ（Arvinte）ほか、バイオケミストリー（Biochemistry）、前掲〕。

操作は以前には生体内の特定細胞に対する異なる分子の標的送達のために開発された〔ニコラウ（Nicolau）ほか、ビオシミカ・エ・ビオファジカ・アクタ（Biochim. Biophys. Acta），805，354～367（1984）〕。そのような標的性は二重層中に特定期的に選択された脂質質を有したリポソームの使用により実現された。そのような脂質質はそれらの上の、標的細胞の形質膜上の1またはそれ以上のレクチン（一定の型の炭水

化物構造に特異的に結合する植物細胞から誘導された物質)により認識された末端炭水化物の存在を基にして選択された(ニコラウ(Nicolaou)ほか、アロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.)、80, 7128~7132 (1983)参照)。そのような方法が働くには、標的細胞がその膜内に他の細胞の膜内に存在する分子に対し特異性でそれに結合する受容体を含まねばならない。次に細胞の融合を誘発することが必要であり、それはフソーゲン物質を用いて実験的に、または自然にウイルス感染由来するタンパク質のような一定の融合剤により行なうことができる(ガロ(Gallo)ほか、サイエンス(Science), 224, 500~503 (1983))。

発明の概要

本発明の目的は、種々の細胞毒素および溶菌物質、有利にはタンパク質リシンを吸込ませたCD4保持細胞、有利には赤血球、あるいはリボソームを生成させることによりHIV感染細胞とCD

4保持細胞との選択的融合を利用する事である。そのような方法はHIV感染細胞の選択的な殺害を生ずる。そのような目的は形質膜または脂質二重層(場合による)中にCD4抗原をもち、かつ細胞障害物質例えはリシン、ゲロニンおよび(または)それらと等価の物質を含有する一群のエンジニアード(engineered)赤血球またはリボソームの構築により実現される。

本発明の他の目的は抗原を細胞の形質膜中へ導入する方法を提供することである。

本発明の目的はまた、毒性および細胞溶解物質を選定リボソームおよび細胞中へ吸込ませる方法を提供することである。

本発明の他の目的は、そのようなエンジニアード細胞またはリボソームの最適量を罹患患者中へ導入し、ウイルスが感染標的細胞内で複製するかまたは他の健全細胞に対する細胞の結合を促進してウイルスを拡散したままそれらに対する身体的防護を阻害することができる前に、これらの細胞またはリボソームを生体内でウイルス感染細胞と結合させ、それと融合して破壊させることによりウイルス疾患状態を軽減することである。

本発明の目的はまた、CD4タンパク質を膜中へ挿入することにより修飾した異種赤血球(および(または)リボソーム)を投与し、その結果、これらの細胞(および(または)リボソーム)をHIV感染細胞に選択的に結合させ、付随して融合させてHIV感染細胞を循環から排除させる方法を提供することである。

これらおよび他の目的、目標および利点は本発明により実現される。

本発明は、細胞の他の細胞に対する結合およびそれとの融合を誘発する抗原タンパク質を膜中へ導入された、例えは人为的に吸込ませた動物例えはヒト由来細胞に関する。

本発明はまた、薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された前記動物由来細胞の、1種またはそれ以上の細胞障害物質と協力した治療有効量を投与、例えは注射、することを含むウイルス誘発疾患の治療に関する。

本発明はまた、薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された前記動物由来細胞の、1種またはそれ以上の細胞障害物質および(または)リボソームを組成物を指向する。

発明の詳細な説明

(a) 発明の性質

本発明は、ヒトCD4抗原を形質膜中へ吸込み、エンジニアード細胞と融合する細胞を破壊できる1種またはそれ以上の細胞障害物質を細胞内に含有する型のエンジニアード赤血球を具体化する。これらのエンジニアード赤血球の代りにリボソームを製造して同様に用いることができる。本発明はまたこれらの細胞を正常赤血球から製造する方法に関する。本発明はさらにこれらのエンジニアード赤血球(またはリボソーム)をウイルス感染により起きた疾患、特に後天性免疫不全症候群(エイズ)の治療に使用する方法を具體化する。もちろん、エンジニアード赤血球が示されるとき常に本明細書に記載する修飾リボソームもまた使用できることを留意すべきである。

提案した治療の主な特徴は次のとおりである。膜上にCD4受容体をもつ赤血球はウイルスgp120表面糖タンパク質を表現する循環HIV感染細胞に結合できる。そのような凝集体は次いで脾臓マクロファージおよび肝臓のクッパー(Kupffer)細胞により循環から除去される。

細胞凝集体の取込みによるこれらの細胞の細胞の可能な感染を防ぐために、一定の抗HIV薬例えばAZT-またはDDC-ミリニ酸(AZTはアジド-3'-デオキシチミジンであり、DDCはジデオキシチミジンである)が注射前にCD4保持赤血球中に封入される。食作用は薬物の存在なくHIV感染細胞の破壊を有効に生ずるけれども、赤血球中のそのような抗HIV薬の取込みにより追加の保護が生ずる。

HIV感染細胞が選択的に結合し、ついにはCD4抗原を有する非感染細胞と融合する傾向があるので、我々はこの抗原を形質膜上有する細胞が、赤血球であっても、HIV感染T細胞および(または)HIVウイルス自体と選択的に結合

し、おそらく融合することを仮定し、証明した。HIV感染細胞が細胞溶解物質を含む他の細胞と融合すると感染細胞が破壊される。

ウイルス感染細胞の破壊における作用物質として臨床的に有効であるために、エンジニアード細胞は次の性質を有さねばならない：(1)それらが長く持続する、すなわち生体内で少くとも細胞、この場合赤血球、の正常寿命に接近する寿命を有さねばならない；(2)それらが、それらに含まれる細胞障害物質が身体の組織に無作別に作用しないような低毒性でなければならない；(3)それら自身が、それらの中に置かれた毒素により不利に影響されではならない(そうでないと、それらが癌の細胞を接し出して選択性に融合できる前にも毒されるであろう)；(4)それらはまた標的(すなわち感染した)細胞との融合にのみ選択性であって他の健全な細胞とは結合も融合もしてはならない；(5)それらは、それらがレシピエンント中で不利な抗原反応を起し従って患者のすでに負担のかかった免疫系にさらに負担をかけること

のないように非免疫源でなければならない。本発明に含まれる修飾赤血球(およびリボソーム)がそのような役割に対する良好な候補であることが発見された。これは、それらが他の細胞の生体緊密装置を欠き、それらの寿命の間実質的に血流中の酵素を運ぶ役目をするヘモグロビンの裏にすぎないためである。従って、それらは、それら自身その中の種々の細胞障害物質の存在により不利に影響されない。赤血球は血流中の最も多い細胞の1つであるので、抗原修飾赤血球によるその少部の置換は生物体にとってほとんど重大でない。さらに、毒素が修飾赤血球内に隔離されるので、単に注射された治療薬の場合のように生物体の組織と不規則に相互作用することが自由でない。
問 リボソーム

水性媒質を囲む脂質二重層(2分子の厚さ)からなる。

リボソームは一般に水性媒質中の脂質の音波処理により、乾燥脂質層の緩衝液中の再懸濁により、または有機溶媒中に溶解した脂質の選択緩衝液に

対する透析により形成することができる。

リン脂質はそれを水と混合すると一部は分子が両性である：それらが疎水性(水不溶性)尾部および親水性(水溶性)または「極性」頭部を有するので閉鎖液体充填球体を形成する。2つの脂肪酸鎖、それぞれ10~24個の炭素原子を含む、が多く天然存在するリン脂質分子の疎水性尾部を構成する。若干の水溶性分子に結合したリン酸が親水性頭部を構成する。十分高い濃度のリン脂質を水と混合すると疎水性尾部が自然に一緒に並んで水を排除し、親水性頭部が水を結合する。

その結果、脂肪酸尾部が膜の内部へ向き、極性頭部基が外方へ向く二重層である。膜の1表面における極性基はリボソームの内部へ向き、他の表面におけるものは外部環境の方へ向く。研究者に薬剤のリボソーム中への装入を可能にさせるのはリン脂質と水とのこの顕著な反応性である。リボソームが形成されると、水に加えた水溶性分子が球の内部中の水性空間中に取込まれ、小胞形成中に溶液に加えた脂質可溶性分子が脂質二重層中へ

取込まれる。

薬物送達に使用されるリポソームは典型的には直径が250オングストローム単位～数ミクロンの範囲内にあり（対照として、赤血球の直径は約10ミクロンである）、通常溶液中に懸濁される。それらは2つの標準形態：流体により分離された若干の脂質二重層で構成される「タマネギ状皮膚」をもつ多重ラメラ小胞（M L V）および完全に液体のコアを閉む單二重層からなる單ラメラ小胞、を有する。单ラメラ小胞は典型的には小（S U V）または大（L U V）である特徴を有する。

適当な環境下で、リポソームはほとんどの任意の細胞型に吸着できる。それらが球を吸着するとリポソームは若干の細胞により取込まれ、または飲み込まれることができる。吸着されたリポソームは細胞膜と脂質を交換することができ、またときどき細胞と融合できる。融合が起るとリポソーム膜は細胞膜中へ取込まれ、リポソームの水性分は細胞中の流体と併合する。

多くの型の細胞により吸着され、結合され、つ

いには吸収され、そのときそれらの内容物を徐々に遮離するリポソームの能力が、リポソームを時間放出薬物供給系に対する優れた候補にする。薬物がリポソームからどのような速さで放出されるかはリポソームの組成、封入薬物の型および細胞の性質を含む多くの因子による。

リポソームのエンドサイトーシスは限定種類の細胞、すなわち異質粒子を攝取できるもの、の中で生ずる。食細胞の細胞がリポソームを吸収すると、細胞は球をリソソームとして知られる細胞下オルガネラ中へ移動させ、そこでリポソームの膜が分解されると思われる。リポソームの脂質成分はリソソームからおそらく外方へ移動して細胞膜の一部となり、リソソームの分解に耐性の他のリポソーム成分（例えば一定の薬物）は細胞質内へ入ることができる。

脂質交換はリポソームからの形質膜中の個々の脂質分子の移動（およびその逆）を含み；リポソームの水性分は細胞内へ入らない。脂質交換が起るにはリポソーム脂質が標的細胞に関連した特

定の化学を有さねばならない。リポソーム脂質が細胞膜に接合した後、それが長時間膜中に保持され、または種々の細胞内の膜へ再分配されることができる。薬物がともかくそのような交換性脂質に結合すれば、それは脂質交換中に潜在的に細胞膜中へ入ることができる。

(c) 病原

本発明はヒトおよび動物の種々のウイルス、細菌、アレルゲンおよび寄生虫疾患との戦いに使用できる。

従って、本発明は次のウイルスとの戦いに使用できる：H I V、B型肝炎ウイルス、インフルエンザ血球凝集素（A／メンフィス／1 0 2／7 2株、A／Eng 1 8 7 8／6 9株、A／N T／6 0／6 8／2 9 c株、およびA／Q u／7／7 0株、A o／P R 8／3 4、A 1／C A M／4 6、並びにA 2／シンガポール／1／5 7；B型インフルエンザウイルス、例えばB／Lee 4 0）、家畜ベストウイルス血球凝集素、ワクシニア、ボリオ、黒疹、サイトメガロウイルス、痘瘡、单纯ヘルペ

S 1および2型、黄熱、感染性エクトロメリニアウイルス、牛痘ウイルス、ウシ伝染性鼻氣管炎ウイルス、ウマ鼻肺炎（ウマ派生）ウイルス、ウシの悪性カタルウイルス、ネコ鼻氣管炎ウイルス、イスヘルベスウイルス、エブスターイン・バーウイルス（伝染性單核症およびバーキット・リンパ腫と関連）、マレーク病ウイルス、ヒツジ肺リンパ節腫症（ヒツジ肺臓症）ウイルス、サイトメガロウイルス、アデノウイルス群、ヒト乳頭瘤ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ミンク腫炎ウイルス、サケ類（trout）の伝染性脾臓壊死ウイルス、魚類内韌ウイルス（種々の系統）、ニワトリ白血病ウイルス（内臟、赤芽球および骨髄芽球）、大理石骨病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パラインフルエンザウイルス1、2、3および4、ムンプスウイルス、トルコ（Turkey）ウイルス、カナダ／5 8、イスジステンバーウイルス、麻疹ウイルス、R Sウイルス、例えばインフルエンザB型ウイルス（例えばB／Lee／4 0；狂犬病ウイルス；東部ウマ脳炎ウイルス；ベネズエラウマ脳

炎ウイルス；西部ウマ脳炎ウイルス；黄熱ウイルス；デング1型ウイルス(=6型)、デング2型ウイルス(=5型)、デング3型ウイルス、デング4型ウイルス；日本脳炎ウイルス；キャサナー森林病ウイルス；斑疹病ウイルス；ミューリー谷脳炎ウイルス；オムスク出血熱ウイルス(ⅠおよびⅡ型)；セントルイス脳炎ウイルス；ヒトライノウイルス；口蹄疫ウイルス；ボリオウイルス1型；エンテロウイルスボリオ2；エンテロウイルスボリオ3；ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス；ブタ伝染性胃腸炎ウイルス；リンパ球性麻疹細胞炎ウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；ピチンダ(Pichinde)ウイルス；タカリベウイルス；乳頭腫ウイルス；シンドビスウイルス；など。

本発明はまた細菌例えはらい病、結核、梅毒および淋疾を起すものとの競いに使用できる。

本発明はまた寄生虫、例えはマラリアを運ぶ生物体(熱帯熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫など)、住血吸虫症、回腹糸状虫および他のフィラ

リア寄生虫、トリバノソーマ、リーシュマニア、シャガス病、アメーバ症、鉤虫などとの競いに使用できる。

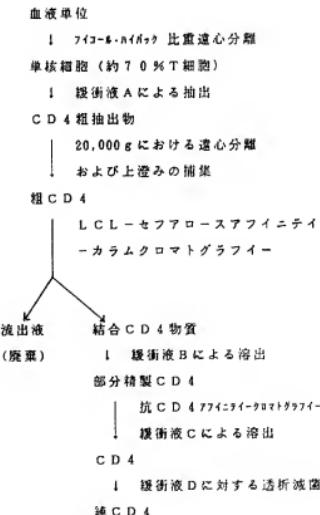
本発明は修飾細胞およびリボソームの特定細胞および組織に対する標的性を可能にすることで、それはまた癌増殖との競いに有効であることができる。

(e) 純CD4の製造

HIVによる正常T細胞の破壊にはウイルスによる細胞の感染とその後のウイルスによりコードされる特異糖タンパク質の生成、並びに感染細胞の形質膜中へのこれらの糖タンパク質の挿入が包含される。この糖タンパク質は表面上にCD4抗原を含む他の細胞に対する親和性を有する。ヒト白血球抗原、CD4、は血液バンクからの血液の遠心分離後に得られたバフィーコートを含む種々の源から、並びにT細胞リンパ腫細胞系(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)から得られるCEM-T細胞)

から分離することができる。CD4抗原はマドン(Madden)ほか、セル(Cell)、42、93~104(1985)の操作により精製できる。

この操作に対する一般的な式は次に示される：



精製 C D 4 はすぐに使用でき、また - 2 0 ℃ で 2 ~ 3 ヶ月安定である。上記図式中、緩衝液組成は次のとおりであることができた：

緩衝液 A = 0.02 M n - オクチル - β - D -
グルコシド (OGS)
0.15 M NaCl
0.2 M PMSF
0.01 M トリス、最終 pH = 8.0
緩衝液 B = 0.1 M β - マンノシドを含む緩衝
液 A

緩衝液 C = 1% (w/w) デオキシコール酸ナトリウム
1 M 酢酸ナトリウム、最終 pH = 4.0

緩衝液 D = 0.1 M 酢酸ナトリウム、最終 pH = 4.7

上記緩衝液 A 中の PMSF (フェニルメチルフルオロ酸) は抽出および精製操作の間タンパク質分解の阻止に使用される毒性物質である。しかし、それは後のクロマトグラフィー段階により完全に除去される。

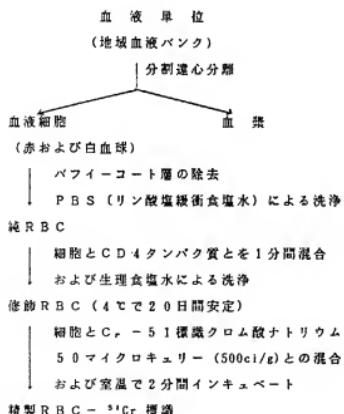
OGS (オクチルガラクトシド) は C D 4 の抽出に使用される洗浄剤である。後に精製工程にお

いてそれは天然存在胆汁酸塩であり、毒性でない D O C (デオキシコール酸塩) により置換される。D O C (デオキシコール酸ナトリウム) は精製 C D 4 中に 0.005% の濃度で存在し、本発明により治療したエイズ患者の血液中に約 0.00001% の濃度で存在する（それは全く安全である）。

ヒト C D 4 タンパク質はまた種々の細胞中の組換え C D 4 分子として得ることができる
(ウォルトン (Walton) ほか、セル (Cell) 、
1988、印刷中)。

(i) エンジニアード赤血球を形成する細胞融合

本発明によるエンジニアード赤血球を形成する一般的操作が次に略示される：



上記図式中で生成された修飾 RBC (赤血球) (未標識) は約 50,000 分子の C D 4 每細胞を含み、2 0 ℃ で 2 0 日まで安定である。

クロム標識修飾 RBC は毒性研究のみに用いたのでそれらの製造は任意であり、それらは通常治療目的に対する本発明の実際の実施に使用されないがしかしそれらを使用できる。そのような標識細胞は活性物質として本発明を用いる試験管内診断法における使用が見出されよう。

赤血球膜へ C D 4 を挿入する他の方法は初めてタンパク質をリポソーム膜へ挿入し、次いでそれを赤血球と融合させて膜中に C D 4 を含む細胞 - リポソームハイブリッドを生成させることである。さらにこの方法は後の融合で細胞、有利には赤血球に対するリポソーム封入分子 (有利には細胞毒または治療物質) の送達を生ずる。

赤血球を連続溶解および再封する技術は再封赤血球 (イーラー (Ihler) ほか、P N A S 、70、2663 ~ 2666 (1973)) およびエンドサイトーシスによる装入細胞 (イーラー (Ihler)

ほか、ジャーナル・オブ・アプライド・バイオケミストリー (J. App. Biochem.)、4、418～435 (1982) の既知概念を基にして開発された。これらの方法は、種々の分子を細胞中へ封入し、その寿命を不変に保つことを可能にする (ニコラウ (Nicolau) ほか、B.P. 83-401364-1 (1983) およびニコラウ (Nicolau) ほか、アナス・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス (Ann. N. Y. Acad. Sci.)、445、304～315 (1985))。本発明には生体中のウイルス感染細胞との最終融合およびその破壊に対する「標的化弾丸」として作用できる修飾赤血球 (またはリボソーム) が含まれる。

リゾチームが酸性pHでリボソームと赤血球ゴーストとの融合を誘発することが既に示された (アービンテ (Arvinte) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Nat. Acad. Sci.), 83巻、962～966 (1986))。その操作においてリゾチームは音波処理小胞 (リボソーム) の外

部膜に共有結合させ、これらの小胞とヒト赤血球ゴーストとの融合の誘発に作用させた。融合の強い誘発が最適リゾチームpHで認められた (それはリゾチームを単に懸濁液に加えたときに認められなかった)。この操作は、リゾチームが電気的に中性のリボソーム相互の融合を誘発しないので有用であり、従って、リボソームと細胞との融合に十分適する。

本発明には媒質中にリゾチームを全く存在させないで融合を誘発させる方法が含まれる。これは大規模臨床使用に対するエンジニアド赤血球の形成を非常に容易にする。

(iii) エンジニアド赤血球の毒性

エンジニアド赤血球 (種々の捕捉物質例えばイノシトール六リン酸イソチオシアナート標識リシンを含む) の寿命がほぼ正常値であることが示された (ニコラウ (Nicolau) ほか、アナス・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス (Ann. N. Y. Acad. Sci.)、前掲)。さらに、これらの細胞の、子豚中の30日の期間

にわたる生体内毒性が追跡された。簡単に記載すると、少量のエンジニアド細胞の注射 (30～40% 被覆物質被覆細胞、すなわち細胞懸濁液のヘマトクリットが30～40%である、約0.1～1mLを静脈内に注射した) 後、動物血液、例えば子豚の血液、の試料を30日の経過にわたってときどきとった。これをイオン (K、Na、Cl、Caなどを含む) の濃度並びにタンパク質、尿素おおびグルコース濃度について検定した。

ゲロニンを封入したマウスRBCの寿命測定値は正常マウスRBCの寿命に比べて有意な変化を示さなかった (ともにマウス中で約11日の半減期を有する)。

毒性試験の間、動物を30日の期間にわたって種々の時間隔で剖検し、肝臓タッパー細胞および脾臓マクロファージの状態を調べた。遊離免疫毒素 (リシンが毒素であった) の直接殺細胞は網膜内皮系中の組織損傷を示した。脾臓および肝臓中のマクロファージは毒素を循環から除去する (ビッタ (Vitetta) ほか、サイエンス (Science)、

219、644～650 (1983))。しかし、本発明により用いた免疫毒素による腎臓細胞に対する損傷がなく、毒素積載エンジニアド細胞が毒性でないことを示した。他のエンジニアド赤血球に対する含有毒素の主標的は脾臓マクロファージであろう。これらの細胞が幹細胞により置換されることができるので、生ずる損傷は不可逆性ではないであろう。さらに実験証拠は、骨髄中の細胞からのマクロファージの置換のために脾臓内皮系を消耗させることができることを示した (ファン・ファース・アンド・コーン (Van Furth and Cohn)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.)、128、415～424 (1968))。

(iv) 標的細胞との融合

適当な免疫系の機能化に必要なT4細胞がCD4抗原を有するので、それらが感染細胞に選択的に結合し、ついには溶解される。溶解は培養細胞中への放射性成分例えばCr-51の取り込みにより試験管内で測定できる。細胞上の媒質中の同位

元素の量離（ウエル型カウンターを用いてモニタードした）は溶解の尺度である。そのような溶解はシンシチウムの形成と（CD4含有細胞とHIV感染細胞との融合により発生するので）相関する。そのような融合は後記の実施例5の操作によりモニタされ、結果は相当する表1（後掲）に示される。

CD4抗原を挿入された赤血球はフリーズエッティング電子顕微鏡検査並びに薄片電子顕微鏡検査により調べることができる。簡単に記載すると、CD4抗原を有する赤血球をマウス单クローニ性抗CD4とともにインキュベートする。洗浄後、これらの細胞を、ヤギ抗マウスIgGでコートした10nm金ビーズとともにインキュベートした。フリーズフラクチャーレプリカ中で10nmビーズがクロス判断赤血球の周囲の周りに観察された。観察ビーズの数毎細胞はフラクチャーの偶然性に依存し、必らずしもその細胞に結合したビーズの実際の数の尺度ではない。最良の場合にビーズはクロス判断赤血球の1側に沿って40～50nm

の間隔で規則的に並んで見える。エッティングにより生じた「タマネギ環」効果のために赤血球膜からのビーズの距離を正確に決定することができない。同一試料の薄片中に電子濃密10nm金ビーズもまた赤血球の膜表面に観察される。HIV感染H9細胞とともにインキュベートした後のCD4保持赤血球のフリーズエッティング像は赤血球膜面上の膜タンパク質の分布を変えた100nmの「不規則性」または「押出」を示した。これはウイルスの赤血球との（おそらくCD4抗原に対する）融合を示唆する。

二重層中にCD4を有する調製リボソーム（実施例1、後記、による）はフリーズエッティング電子顕微鏡検査により調べることができ、300～500nmの範囲の直径の単ラメラおよび多重ラメラの両方であると認められる。リボソームをHIV感染H9細胞とともに8時間インキュベートした後、ウイルス粒子はCD4タンパク質挿入リボソームに結合されるが、しかしこのタンパク質のものには結合しないことが認められる。

これはまた、本発明により膜中へ挿入されるとタンパク質が適当に配向されることを示す。ウイルス粒子は大きさ（約100nm）および膜タンパク質の存在の両方により確認することができる。リボソームは大きさおよび封入デキストランにより確認された。

CD4リボソームと感染細胞との融合およびリボソームの内容物の細胞内部への送達を示すために次の操作を用いることができる。フェリチンを封入しているCD4-リボソーム（実施例1（後記）の一般操作による）をHIV感染H9細胞または正常H9細胞とともに8時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄して固定する。CD4を有しないがしかしフェリチンを封入しているリボソームを同様に用いる。

薄片電子顕微鏡検査はリボソームに封入されたフェリチンが感染細胞中の脂質小滴へ移動したことを見た。リボソームが感染細胞内の大細胞質液泡内に認められた。細胞の形質膜とのリボソームの融合の例もまた認められた。これらの結果は

リボソームがCD4抗原を有しなかった場合に認められなかった。

膜中にホスファチジルエタノールアミンリサミンローダミン（ロードミンは蛍光染料であり、こゝでは脂質に結合している）を有して形成され、P1-デキストランを封入するCD4保持リボソームをHIV感染H9細胞とともに8時間インキュベートし、次いで洗浄して固定する。同様の、しかし二重層中に存在するCD4抗原のないリボソームを用いて類似の操作を追跡する。

フリーズエッティング像は、ウイルス粒子がCD4をもつリボソームに結合したが、それのないものに結合しなかったことを示した。さらにCD4抗原を有するリボソームがHIV感染H9細胞との融合の過程で示された（すなわち、それらが明らかな膜の連続性を示した）。CD4抗原の存在しないリボソームは細胞膜の上に載っているが、しかし実際の融合の証拠を示さなかった。

これらの細胞の蛍光分析は、リボソームがそれらの二重層中にCD4抗原、並びに脂質ローダ

ミン接合体を有した実験で有意なローダミン蛍光を示した。この蛍光は拡散し、また中断したが、しかしすべての場合に細胞の核から排除された。拡散蛍光はリボソームが細胞の形質膜と融合したことを示す。中断蛍光は細胞表面上に集まるがしかし融合しないけれどもおそらく結合および融合の初期段階にあるリボソームのためにあることができる。それはまた細胞の消化画室中のリボソーム成分の隔離、並びにリボソームのエンドサイトーシスの結果に基づくことができる。しかし、様からの染料の排除が細胞がなお生存可能なことを示す。

同様の試験に未感染健全 H 9 細胞を用いた場合に、率にときどき蛍光が細胞表面に付着したリボソームから検出された。CD 4 抗原をもたないリボソームを用いたときに H 9 細胞の感染または非感染に関係なく有意な蛍光が検出されなかった。

CD 4 抗原をもつ細胞はまたウイルス糖タンパク質 (gp 120) をもつ感染細胞に結合するので、毒素産生細胞またはリボソーム（膜中に取込

まれた CD 4 抗原を有する）の使用はこれらの細胞またはリボソームと HIV 感染細胞とを融合させ、その後、それらが健全な T 4 細胞に結合してそれと融合できる前に後者が破壊される。これは患者の免疫系を HIV 感染細胞によるそれ以上の破壊から、望ましくはそれが修復できない損傷をうける前に防止作用をする。

本発明に有利に使用できる毒素の限定的でない例にはリシン (MW 25,000 のタンパク質、その毒性 A 領が必要なすべてである)、アブリン（一定植物の種子から得られる有毒アルブミン）、ゲロニン (MW 23,000 の、非免疫源である利点を有するタンパク質) およびジフェチリ毒素が含まれる。これらの多くは市販されている。ゲロニンはピール (Pihl) ほか、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、255、6947～6953 (1980) の方法により調製される。本発明の実施例が後に示され、毒素としてリシンおよび（または）ゲロニンの使用に関して示されるが、しかし、任意の適当な細胞障害

物質を、基本操作を大きく変形することなくこれらの代りに用いることができる。

(i) 肝臓使用

本発明を構成する修飾細胞を、HIV 感染リンパ球を修飾細胞から選択的に排除することによるエイズの治療に用いることができる。操作にはエイズウイルスに対する受容体 (CD 4 抗原) を自己赤血球膜へ挿入することを含まれる。感染細胞はその外部表面上に gp 120 フォーゲンタンパク質を発現し、従って CD 4 含有細胞を結合する。エイズ患者中でリンパ球（通常 CD 4 抗原をもつ）は HIV 感染細胞（通常 gp 120 タンパク質をもつ）に結合し、これが、すべての細胞が感染するかまたは死ぬまで感染の拡散を生じ、従って免疫系の一般的滅退をもたらす。もちろん、HIV 感染リンパ球は、正確に T ヘルパーリンパ球とではなく、CD 4 をもつ細胞と結合し、融合する。前記のように、これには CD 4 をもつ赤血球が含まれる。CD 4 - 赤血球がその中に細胞障害物質を含む場合に、融合は両細胞の死を生ずる。

さらに、ウイルス自体が CD 4 タンパク質に結合するので、血液中の遊離ウイルスが CD 4 保持赤血球に結合し、その中に隔離される。赤血球が遺伝装置を欠くのでウイルスはその中に繁殖できない。従って二重の効果があり：血液中の少量の遊離ウイルスを隔離し、また一層重要なことには gp 120 をもつ感染リンパ球が健全な T 細胞に結合しウイルスを拡散することができる前にそれと融合し、破壊する。

エンジニアード赤血球の静脈内注射に加えて、毒素をリボソームの使用により他の組織中へ選択的に導入することができる。例えば、リボソーム（その二重層内に CD 4 抗原をもち、リボソーム内に封入されたゲロニン、リシンまたは若干の他の毒素を含有する）のリンパ節内への組織内 (interstitial) 注射（例えば指間）によりリンパ節中に存在する感染細胞を選択的に攻撃することができる。そのような治療の方法の利点は、こゝに提供される方法により発生されるリボソームが小細胞の大きさに接近する大きさであり、従っ

て注射後のエンドサイトシスにより分解されないことである。

さらに、本発明を構成するCD4をもつ細胞およびリボソームは、試験管内検定の一部としてgp120をもつ（すなわち、感染した）リンパ球の存在の検出に使用できる（後記実施例5の操作を用いる）。そのような操作には本発明による細胞またはリボソームの生成が含まれる。診断試薬を構成する細胞またはリボソームはそれらの膜中にCD4抗原を有し、それらの細胞質中に細胞障害物質を含有し、放射性物質、有利にはクロム-51で標識される。HIV感染細胞がgp120ウイルスタンパク質をそれらの膜内にもつてそのような細胞は、CD4をもち、毒素を含有し、放射性標識した細胞と融合し、次いで放射性標識を周囲媒質中へ遊離する。

本発明を診断試薬として用いるには、患者、場合によりエイズをもつ疑いのあるもの、から血液をとり、白血球（特にリンパ球）を標準操作（例えば、本明細書に既に記載した操作）により増殖

し、リボソームが例示のために使用される後記実施例5に記載されるように、小分割量を試験管内で本発明の細胞またはリボソームの分割量と混合する。37℃またはその付近で細胞融合が起る十分な時間、最適には24時間まで、インキュベーションした後、細胞質の試料を捕集し、放射能を測定する。測定は正常なヒトの血液の白血球を対照として用いて二重に行なわれる。対照細胞と比較して患者からとった細胞の周囲の媒質中の放射能（捕正式による計算後）の高水準の検出は融合、それにより患者の血液中にgp120タンパク質を含む細胞の存在することを示す。後者は前記細胞がエイズウイルスで感染されたことおよび従って患者がエイズをもつことを意味すると解釈される。CD4以外の抗原を本発明の細胞またはリボソームの膜内に導入できるので他のウイルス疾患を、この操作を用いて診断することができる。これまでに、エイズに対する診断操作は通常エイズをもつ疑いのある患者の血液中のHIV抗体の存在の検出による。しかし、そのような所見は必

らずしも疾患の発生を示さないで、単に患者がウイルスまたはその抗原の若干にさらされたことを示す。こゝに開示された診断法は、ウイルスが複製されている感染細胞の存在、すなわち活性感染、を示す利点を有する。出願人はそれらのすべての等価物を期待する意図である。

本発明を構成する細胞およびリボソームは、さらに治療量のHIVに対する受容体をもたない。しかしHIV感染細胞はそれらの表面上に異質抗原を発現し、ついにはマクロファージおよびクッパー細胞により吸収され捕食される。この経路は細網内皮系の細胞の感染に、不本意にもそれらの表面上のCD4抗原がウイルスにより使用される。これらの細胞を、ウイルスの往還となりその複製を許すことから保護するために本発明の細胞およびリボソームを、治療量の抗エイズ薬をマクロファージ、クッパー細胞および細網内皮系の他の細胞

に直接送達するために使用できる。これは、これらの細網内皮系の細胞が感染細胞および他のウイルス汚染碎片を攝取した後ウイルスで感染されるのを保護する効果を有する。

例としてAZT（アジドー-3'-デオキシチミジン）、リバパリンおよびDDCが本発明の細胞およびリボソーム内に容易に封入される。これは1987年3月24日に発行された米国特許第4,652,449号に開示された封入操作を用いることにより最も容易に達成され、それらの開示は特にこゝに参照される。治療薬の封入の前または後に、本発明の操作を用いて適当な抗原タンパク質（エイズが治療される疾患である場合にはCD4）を赤血球およびリボソームの膜内へ挿入する。その結果、赤血球またはリボソームは中に治療量の活性抗エイズ薬を含有し、それをエイズウイルスで感染された細胞へ向かわせ、その細胞との融合を誘発させる作用をするCD4抗原を膜中に取込んでいる。融合後、この融合細胞複合体は異質（感染細胞または細胞類の膜中のウイルスコードタン

バク質のため)と認識され、マクロファージおよび他の細胞内皮細胞により捕食される。その結果、抗エイズ薬が直接食細胞の細胞内へ導入され、これらの細胞中のウイルスの複製を防ぎ、従ってウイルスがそれ自体複製できる他の道筋を閉鎖する。

そのような方法の利点は、薬物が血液中に逃避しておらず、従って望ましくなく有害な副作用の生起に利用できることである。さらに、薬物を運ぶ細胞またはリボソームの膜内の抗原が、腹中に $g p 1 2 0$ タンパク質をもつ細胞(すなわち、HIV 感染細胞)に対し特異性であり、健全な細胞が薬物にさらされず、従って薬物の固有の毒性が非常に低下する。最終の結果は薬物の全量を減少させ、従って全コストが低下され、薬物の有効治療細胞質濃度がまた増加される(それが身体全体に無駄に拡散しないため)。他の利点は、薬物が抗原修飾された赤血球およびリボソーム内に有効に隔離されるので、身体の組織液(ウイルス感染細胞が存在するがほとんどない場所)に拡散することができないことがある。

ることが含まれ、典型的には 5 μ の全重量を用いた。この混合物(最終濃度 1 ~ 3.0 mM)を直糞の流れ下に、次に真空下に 1 時間(残留する微量の有機溶媒を除去するため)薄膜に乾燥した。リボソームは逆相蒸発(reverse phase evaporation)により調製した〔Szoka, プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.), U.S.A., 75 卷, 4194 ~ 4198 (1978) 参照〕。簡単に記載すると、脂質物質を新蒸留エーテル 4.5 μ で溶解し、浴型音波処理器中でリン酸塩緩衝食塩水(PBS) 1.5 μ とともに 1.5 秒間音波処理した。可溶化は洗浄剤/脂質モル比が 8 : 1 にあるように n -オクチル-D-グルコビラノシド(OG) の添加により補助した。エーテルを回転蒸発器中で減圧下に除去し、リボソーム懸濁液を PBS で、またはホウ酸塩緩衝液 pH 7.2、中に 4.5 μ に希釈した。あるいはリボソームを、疊水性ビーズ上の吸着を用いるフィリップト(Philippe)

本発明は次に以下の限定的でない実施例に申して記載される。

実施例

実施例 1

ヒト白血球抗原 CD 4 の赤血球形質膜への挿入

(a) リボソームの典型的な調製を次のように行なった: 使用する脂質(使用前に 2 : 1 (v/v) クロロホルム / エタノール中に -30°C で保存した)を種々の割合で混合した。最も普通の操作にはホスマチジルエカルタミン(シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) から購入し、シングレトン(Singleton)ほか、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・オイル・ケミスト・ソサイエティー(J. Am. Oil. Chem. Soc.), 42 卷、53 ~ 61 (1965) に従って精製)、ホスマチジルコリン(シグマ・ケミカル社製)ホスマチジルセリン(シグマ社製)およびコレステロール(シグマ社製)をそれぞれ 1 : 2 : 1 : 1.5 のモル比で混合す

ほか、ビオシミカ・エ・ビオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、137 ~ 143 (1983) に記載された操作により発生させることができる。

(b) 細胞膜のために、リボソームの懸濁液(ホウ酸塩緩衝液 pH 7.2、1 μ 中に脂質 5 μ を含む)を取込ませるタンパク質を含む溶液と混合した。精製 CD 4 (1% の OG を含む PBS 中 4 ~ 6 μ タンパク質/ μ の濃度)を脂質 + 洗浄剤混合物に加えた。脂質とタンパク質との重量比は 5 ~ 1.0 に維持した。ジメチルスペルミダート(シグマ社から購入)を 10°C の温度で 1.5 μ / μ の最終スペルミダート濃度に達するまで徐々に加えた。次いで混合物を 10°C の温度で 30 分間インキュベートし、次いでホウ酸塩緩衝液に対して 4°C の温度で 2 時間透析した。生じた混合物を次に、未反応タンパク質からリボソームを分離するためにセファロース(Sephadex) 4B カラム上でクロマトグラフにかけた。

この操作は C D 4 抗原約 5,000 ~ 20,000 分子毎リポソームを生ずる。リポソームはフローサイドメトリーおよびフリーズフラクチャーを用いて確認した。それらの内部容積は 1.2 ~ 1.6 リットル毎モル量質であると認められ、それらの平均外径は約 4.5 nm であると認められた。

純 C D 4 を有する再構成に加えて、またタンパク質混合物の一部として C D 4 の量に等しい量のリゾームを用いて操作を行なった。これはそのとき C D 4 とともに取込まれ、修飾赤血球を生成させる後者の融合段階中のリポソーム相互の融合を防ぐ利点を有する。

リゾームの酵素活性は (リゾームが使用されれば) ミクロコッカス・レイソディクチカス (*Micrococcus leisodilekticus*) 検定 (アービンテ (Arvinte) ほか、プロシードイングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A., 83, 962 ~ 966 (1986)) により検定することができる。

/リポソームハイブリッドの小試料の形質膜中の C D 4 抗原の存在を定量的に測定した。

あるいは、C D 4 をリポソームの使用なく挿入することができる。このとき、酔酸ナトリウム緩衝液 (0.02 N, pH 7.4, 0.145 M-NaCl) 1.5 ml、C D 4 を 0.1 ~ 0.4 μg 含む溶液 (1% オクチルグルコシド中) 6.0 μl および赤血球懸濁液 (RBC 梱體 5.0 μl と PBS, pH 7.4, 1 mlとの混合により生成) 3.0 μl をエップendorf 遠心管 (1.5 ml サイズが便宜であった) 中で混合し、37°C で 6.0 ~ 9.0 秒間インキュベートした。上記 3 溶液 (緩衝液、タンパク質および RBC) は混合前に 3.7°C で加温すべきである。インキュベーション後、PBS, pH 7.4, 1.0 ml を加え (細胞の低 pH に対する曝露を停止するため)、次いで反応混合物をエップendorf 遠心分離機の固定角ローター中で 3000 rpm で 4 分間遠心分離することにより細胞を濃縮した。上澄みを除き、次いで細胞を PBS, pH 7.4、中に再懸濁

(i) 新全血を同容積のリン酸緩衝食塩水 (PBS、5 mM リン酸度、1.45 mM-NaCl、pH 7.4) で希釈し、遠心分離 (640 g, 4°C で 30 分) により血漿から分離した。上澄みおよび白血球のバフィーコートはともに廃棄した。多形核白血球を吸収性錐過により除去した。次いで赤血球を PBS、pH 7.4、中に再懸濁し、次いでさらに 3 回洗浄する (各 2,000 rpm で 4°C で 30 分間遠心分離)。

(ii) ヘマトクリットを 7.0% に調整し、次いで赤血球 (約 500 ~ 1,000 万) を等容積のリポソーム懸濁液 (リゾームを有するかまたは有さず、1 ~ 1.0 リポソーム毎赤血球の比を与える十分なりポソームを使用) やび酔酸ナトリウム緩衝液 (0.02 M リン酸ナトリウム / 0.145 M-NaCl) 1.4 ml とともに最終 pH 5.5 で、37°C の温度で 30 分間インキュベートした。次いで 1400 g で、20°C で 20 分間遠心分離することにより赤血球を捕集した。蛍光標識抗 C D 4 抗体による免疫蛍光検定を用いて赤血球

させた。さらに PBS 中で同条件下に 3 洗浄を行なった。

実施例 2 取込み C D 4 抗原の測定

取込み C D 4 抗原の抗原活性の存在をフルオレスインソチオシアナート標識抗 C D 4 抗体を用いて蛍光活性化細胞錐過法 (コールター (Coulter) からのエピックス (Epics) V 細胞錐過器を使用) により測定した。この測定に 2 試料を用いた：

試料 A：C D 4 分子を取り込んだ赤血球、

試料 B：C D 4 タンパク質を含まない赤血球。以下の記載において FITC はタンパク質質に対する蛍光標識のフルオレスインソチオシアナートを示す。

用いた操作は次のとおりであった：

両試料、A および B、を PBS、pH 7.4、で洗浄し、遠心分離 (エップendorf 遠心分離機中で 3,000 rpm で 4 分間) により濃縮した。各試料において、細胞ペレット上に次の単クローン性抗体の 1 溶液、各 1.0 μl を層にした：

(i) 抗 T4 - FITC (Pel-Freez 単クローン性

抗体、M 1 0 2 - 1 0 - O A X、Brown Deer、
W I 53223) 1 0 μg、

- (2) 「Leu - 3 a - Pe」(抗ヒトLeu - 3 a フィ
コエリトリリン接合体、ベクトン・ディキンソン
(Becton Dickinson, Mountain View, CA
94039 製) 1 0 μg、
- (3) 「OKT - 4 A - FITC」(Ortho-mune
OKT - 4 a マウス單クローニ性抗体 - FITC
接合体、抗ヒトインデューサー / ヘルペス T
細胞、オルト・ディアグノスティック・システムズ社 (Ortho Diagnostic Systems, Inc.,
Raritan, NJ 08869製) 1 0 μg。
- 懸濁液をかくはんして細胞塊を抗体溶液と混合
した。細胞を 22°C で 15 分間蛍光標識抗 CD 4
抗体と反応させた。

インキュベーション後、PBS、pH 7.4、1 mL
を 2 試料に加え、細胞懸濁液を再び遠心分離(前記のよう)により濃縮した。上澄み(A および
B)は細胞に結合しなかった抗体を含有し、これを除去した。PBS による洗浄および遠心分離機

約 0.021 mg であった。CD 4 抗原の平均分子
量が約 58,000 ドルトンであり、各インキュベーシ
ョン混合物は約 7 倍量の抗体分子を含有した。

これらの値を

$$R = \frac{\text{上澄み A の蛍光}}{\text{上澄み B の蛍光}}$$

および、N = 抗体分子の数 × (1 - R)
に用い、タンパク質蛍光スペクトル(励起 = 280
nm)から計算した値は R = 1.1 であった。
FITC 蛍光に対する相当する値は R = 1.33 で
あった。

細胞膜中の CD 4 分子が抗体により認識された
と仮定すると、結合した抗体の数は取込んだ CD
4 分子の数(上式中の N)に等しい。R = 1.1 を
用いると N に対する値は 37,000 であった。

R = 1.33 を用いると値は N = 59,300 であった。
用いた値はタンパク質蛍光またはタンパク質結合
FITC 蛍光を測定するかにより、結果は従って
これらの値の平均である。従って我々の計算は
37,000~60,000 CD 4 分子毎細胞を示した。

による標識の操作を 2 回繰り返して各上澄みを除去
した。

細胞を PBS 中に懸濁させて試験した。試料 A
の細胞のみが頭微鏡検査、分光測光および FACS 検
定により蛍光性であったので、それらだけがそれ
らの股中へ CD 4 抗原を取込んだと考えることができた。

さらに、アルールした上澄み中の蛍光物質(FITC)
の量を、470 nm の励起波長および 480 ~
500 nm における発光波長検定を用いて蛍光分
光法により測定した。

タンパク質蛍光測定は 280 nm の励起波長を
前記と同じ発光範囲で用いた。

アルールした上澄み A および B 間の蛍光強度の差
異は赤血球に結合した蛍光標識の量に正比例した。
従って、初期抗体濃度および赤血球の数を知ると
CD 4 分子毎細胞の数に対する平均値を計算する
ことが簡単であった。

上記操作において、各試料 A および B は約 1400
万の細胞を含み、蛍光単クローニ性抗体の全量は

実施例 3 赤血球中のリシン毒素の封入

- (a) 実施例 1 に示した操作により調製した赤血球
を冷 0.15 M-NaCl で数回洗浄し、遠心分離
してペレットを得た。次いで細胞を PBS 中に
pH 7.4 で再懸濁した。
- (b) 次いで赤血球の懸濁液を PBS、pH 7.4、中
に 0.1 mMまでの純リシン毒素(シグマ・ケミ
カル社の精製 A 製)を含む溶液で洗浄した。赤
血球を 1,000 g で 10 分間遠心分離し、上澄み
を廃棄し、最終ヘマトクリットを食塩水で 7.0
%に調整した。
- (c) 赤血球懸濁液を 4°C で冷却し、0.41 平方メ
ートルの透析表面および 1.34 ミクロンの膜厚
を有する背槽の血液透析器の血液画室中へ連続的
に流れさせた。蠕動ポンプで 20 ~ 60 mL/
分の定赤血球流量を維持した。血液透析器は低
イオン強度緩衝液(0.01 M リン酸ナトリウム、
0.01 M 炭酸水素ナトリウム、0.002 M グル
コース)を pH 7.4 で、温度を 4°C に維持して
50.0 mL/分の定流量で供給した。この透析段

階の間に、赤血球を、0.3のK-Na比で1M塩化物塩を含む(毎リットル)高張液1/10容積の添加による再封の前に37℃で溶解して捕集した(高ATP含量を再封細胞中に維持するため)。

- (d) 次いで細胞懸濁液を捕集し、37℃で30分間維持して細胞を再封させた。次いで赤血球を、1mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウムおよび2mMグルコースを含む(毎リットル)0.15M-NaCl溶液で2回洗浄する。次いで赤血球を、選択ヘマトクリットで融合前に未変性自己血漿中に懸濁させる。

実施例4

赤血球中ヘリシンまたはゲロニン毒素を封入させる他の操作

- (a) 実施例1と同じ脂質混合物で開始し、残留有機溶媒の蒸発によりそれをとり、封入させる毒性物質(例えば、リシン、ゲロニンなど)をフィリポット(Philipott)ほかにより記載された操作によりHEPES緩衝液

■ 若干の試験において、バイオーピーズを試験管中のリボソーム調製物に直接加え、回転ミキサー上に置き、10RPMで少くとも3時間回転した。

- (c) 必要なときには、リボソーム懸濁液をセファロース4Bカラムに通して非封入物質を除去した。次いでリシン含有リボソームを実施例1におけるようにリゾチームおよびCD4の挿入に用いる。

- (d) 次いで赤血球を実施例1に記載のようにリシン(またはゲロニン)含有リボソームとともにインキュベートする。融合効率は蛍光顕微鏡検査により、およびFACS分析によりモニターした。大規模製造に対し、蛍光標識が単にモニターのために要求されたので蛍光標識なくリシンを用いて操作を行なうことができる。

[1.0 mM-HEPES(pH7.4) / 1 mM-EGTA / 150 mM-NaCl] 中で導入した。約0.01~0.02μg毎十億リボソームの最終値を与える十分な毒素を用いた。2相系を短時間渦動し、脂質を混合物中の成分の最高転移温度以上の温度で30分間水和させた。少量の洗浄剤(トライトン(Triton)X-100)を加え、試料の容積をHEPES緩衝液で0.625mlに調整した。激しく振りませた後洗浄剤を除去した。

- (ii) 3つの異なる方法を洗浄剤の除去に用いた:
- 試料を1cm幅の透析袋中に置き、0.01Mトリス-HCl(pH7.4) / 1 mM-EDTA / 0.15M-NaCl 1Lに対し、媒質を4交換して透析した。
 - 透析媒質の量を100mlに減少し、バイオーピーズ(Bio-Beads)(型SM-2、バイオーラド社(Bio-Rad, Richmond, CA)型)を袋の外側緩衝液中に加えた。媒質は交換しなかった。

実施例5

ゲロニンを含むCD4-リボソームによるHIV感染細胞の試験管内相互作用

- (a) T細胞集団、H9、をHT細胞系からクローニ化し、細胞の若干をHIV分離株で持続感染した。次いで細胞をRPMI 1640媒質(10%補体除去ウシ胎仔血清、0.2 mMグルタミンを含む)中でヨフエ(Yoffe)ほか、ブロサイディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 84, 1429~1433(1987)に記載されたように培養する。H9/HIV細胞は光学顕微鏡検査により試験したときに未感染細胞とは形態的に区別できない。従って、H9/HIV細胞によるウイルス生成は電子顕微鏡検査並びに標準逆転写酵素検定によりモニタードした。

- (b) 若干が抗HIV抗体に対し陰性であり、若干が陽性であった血液供与者からCD4抗原を含む細胞を得た(ヨフエ(Yoffe)ほか、前掲、

に記載されたように)。

- (c) 細胞を、(Cr-51) クロム敵ナトリウム 0.5 mCi (ニュー・イングランド・ニューカリ ア社 (New England Nuclear, Boston, MA) 製) を用いて 37°C で 90 分間標識し、次いでリソ酸塩緩衝食塩水で 3 回洗浄した。次いで標識細胞を 10,000 細胞毎ウエルの濃度に培養皿中へ塗布した。
- (d) CD4-リボソーム、CD4-リボソームプラス遊離ゲロニン、およびゲロニン封入 CD4-リボソームのそれぞれを、T 細胞を入れた個々のウエルに、5 リボソーム毎 T 細胞の比に加えた。次いで非感染 H9 細胞および HIV/H9 細胞を個々にそれぞれのリボソーム調製物とともに 37°C で 18 時間インキュベートする。
- (e) インキュベーション後、培養から上澄み液の 100 μl 分割量を簡便し、放射能を液体シチレーションにより測定した。各試験に対し試験を 3 回行なった (すなわち、3 培養を各試験に用いる)。結果はパーセント比クロム-51

遊離 (S P R E L) に関して解釈され、それは細胞融合の程度を示し、式、

$$S P R E L = \frac{E R - S R}{M R - S R}$$

(式中、

E R = 試験遊離

M R = 最大遊離

S R = 自然遊離 (である)

により示される。

自然遊離 (S R) は標識細胞 (すなわち、H9 または HIV/H9) のみを入れたウエル中の上澄み液から 0.1 ml 分割量を捕集することにより測定した。

最大遊離は 1%トライトン X-100、0.1 ml で溶解した標識細胞の上澄み液 0.1 ml をとることにより測定した。

放射能はウエルカウンターを用いて測定した。

- (f) 18 時間のインキュベーション後に H9 細胞および HIV/H9 細胞の両方を回収し、洗浄し、トリパンブルーで常法により染色して生存

の程度を測定した。

有意量の Cr-51 遊離が HIV 感染 H9 細胞を CD4 抗原およびゲロニンの両方を含むリボソームに暴露した試験にのみ認められ、CD4-リボソームのみを用いた場合、またはゲロニンが媒質中に遊離し CD4-リボソーム内に封入されなかつた場合には認められなかつた。この試験に対する結果は表 1 に示される。

表 1

インジフェロニンと感染および正常 H9 細胞との融合後の Cr-51 の遊離

試験	細胞	ゲロニン調製物	比遊離
1	H9	---	2800 cpm
2	H9	CD4-リボソーム	2800 cpm
3	H9	CD4-リボソーム + 遊離ゲロニン	2800 cpm
4	H9	CD4-リボソーム (ゲロニン含有)	2800 cpm
5	HIV/H9	---	2800 cpm
6	HIV/H9	CD4-リボソーム	2800 cpm
7	HIV/H9	CD4-リボソーム + 遊離ゲロニン	2800 cpm
8	HIV/H9	CD4-リボソーム (ゲロニン含有)	5700 cpm

* 実験例 5 により 37°C で 18 時間インキュベートした後の 10,000 細胞当りの cpm として示した比遊離

** 遊離ゲロニン濃度は 0.02 mg 每 10⁴ リボソームであった。

実施例 6

エンジニアド赤血球による抗HIV

陽性患者の臨床治療

抗HIV抗体に対して陽性と試験されたヒト患者はリシン、アブリン、ゲロニンまたはジフテリア毒素を含有するエンジニアド赤血球で次のように治療される。患者は充填エンジニアド赤血球（実質的にすべての細胞がCD4抗原および細胞毒を含む）の食塩水懸濁液20mLまでを静脈内（例えば腕中）に注射される。患者の状態を循環中の抗HIV抗体の濃度の測定並びに患者の状態の一般的進行によりモニターする。初期注射は医師が是認されると考えると追加注射により事後処置することができる。

実施例 7リボソームおよびエンジニアド赤血球を用いるARCを有する患者の治療

ARC（エイズ間連コンプレックス）を有すると思われるヒト患者は実施例6とは同様に容態に対して治療される。しかし、このとき患者はエ

ンジニアド赤血球とリボソーム（ともに膜中のCD4および細胞素を含有する）との組合せで注射される。この疾患状態における主目的がリンパ節であるので、有利には患者は組織内（例えば指間）に約1000億個のリボソームおよび最適活性量の修飾赤血球の混合物を注射される。患者の状態は実施例6におけるようにモニターされ、必要に応じて追加治療が与えられる。

実施例 8AZTを含有するエンジニアド赤血球による抗HIV陽性患者の臨床治療

抗HIV抗体に対しまたは本出願において開示された診断法により陽性と試験された患者はAZT-3'-デオキシチミジン（AZT）を含む本発明の抗原修飾赤血球またはリボソームで次のように治療される。患者は充填赤血球またはリボソーム（該細胞またはリボソームは実質的にすべてCD4抗原および細胞質隔離治療量のAZTを含有する）の食塩水懸濁液20mLまでを静脈内（例えば腕中）に注射される。そのような処置は臨床

医により調整され、薬物の全用量は安全限界内、最適には4～6時間当たり100～300mL、に保たれる。次いで患者の状態が循環中の抗HIV抗体の存在の測定（または本出願において示される診断法により）、並びに患者の状態の一般的進行がモニターされる。次いで初期注射は、主治医が是認されると考えると4～6時間毎に追加注射により事後処置される。

明細書および特許請求の範囲が本発明の例示であって限定でなく、また発明の精神および範囲内の他の態様が当業者に連想されると理解される。

第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁴	識別記号	府内整理番号
A 61 K 39/00	G - 7252-4C	7252-4C
45/08	A - 7906-2G	A - 7906-2G
G 01 N 33/544		
33/569		

手 執 捷 正 書 (方式) 
63.10.17
昭和 年 月 日

特許庁長官 肄

1.事件の表示 昭和63年特許願第164103号

2.発明の名称 備入抗原タンパク質を有する動物
由末晶3.補正をする者
事件との關係 出 購 人

名 称 バイオフォア コーポレーション

4.代理人
住 所 東京都千代田区九の内3丁目3番1号
電話 (代) 211-6741
氏 名 (5995) 弁理士 中 村 

5.補正命令の日付 昭和63年9月27日

6.補正の対象 請書の特許出願人の履歴及び
代理権を証明する書面及び
明細書7.補正の内容 別紙のとおり
請書に最初に添付した明細書の添付
(内容に変更なし)方式 